

AUG 17 1995

524 ANSWER 226 OF 368 CIPUS COPYRIGHT 1997 ACS

AN 1994:509581

DN 121:109581

TI Preparation of **oligonucleotide** monolayer

IN Debitsudo, Arubaguri

PA Mitsubishi Chem Ind, Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.

CODEN: JKXXAF

PI JP 06041183 A2 940215 Heisei

AI JP 92-196819 920723

DT Patent

LA Japanese

OS MARPAT 121:109581

AB In an **oligonucleotide** monolayer formed on a **metal** substrate surface, an **oligonucleotide** deriv. (I; R = H, thiol-protecting group; R1 = H, C1-3 alkyl; E = nucleic acid base; X = S, O; Y = H, OH; m = 1-20; n .gtoreq.8) is bonded to the **metal** substrate surface through the S atom. This **oligonucleotide** monolayer is suitable for a **DNA** sensor and as a material for mol. devices. Thus, I (R = R1 = Y = H, X = S, E = 9-adenyl, m = 4, n = 11) (II) was prepd. by the solid phase method using a Applied Biosystems **oligonucleotide** synthesizer. A Si wafer sequentially coated with 250.ANG. Cr and 15,000.ANG. Au vapor deposition films was dipped in a soln. of 0.05 mM II and 0.5 .mu.M dodecanethiol in EtOH for 24 h, pulled out from the soln., and washed with EtOH to give an **oligonucleotide** monolayer with thickness 19.ANG. and contact angle (H2O) 6.degree..

19 97

E

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-41183

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 H 21/04	Z			
21/02				
C 1 2 Q 1/68	Z	7823-4B		

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-198819

(22)出願日 平成4年(1992)7月23日

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 デビッド アルバグリ

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 重野 剛

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド単分子膜

(57)【要約】

【目的】 DNAセンサーや分子素子等の機能材料の用途に好適な単分子膜を提供する。

【構成】 金属基板表面に形成された単分子膜であって、分子内にオリゴヌクレオチド構造を有する化合物が、硫黄原子を介して金属基板表面に結合している構造を有するオリゴヌクレオチド単分子膜。

【効果】 オリゴヌクレオチド構造を有する化合物よりなる単分子膜であれば、DNAセンサー、分子素子用材料として有用な単分子膜が提供される。

1

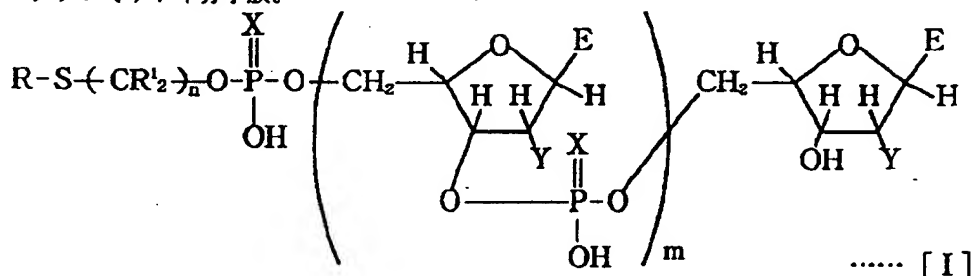
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属基板表面に形成された単分子膜であって、分子内にオリゴヌクレオチド構造を有する化合物が、硫黄原子を介して金属基板表面に結合している構造を有するオリゴヌクレオチド単分子膜。

*【請求項2】 下記一般式(I) で表されるオリゴヌクレオチドから誘導される請求項1に記載のオリゴヌクレオチド単分子膜。

【化1】



(式中、Rは水素又はチオールの保護基を示し、R'は水素又は炭素数1～3のアルキル基を示し、Eは核酸塩基を示し、XはS又はOを示し、Yは水素又はOHを示し、mは1～20の整数を示し、nは8以上の整数を示す。 n=8)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はDNAセンサー、分子素子材料として好適なオリゴヌクレオチド単分子膜に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、アルキルチオール及びその誘導体※
 $HS-(CH_2)_r-M$

※の単分子膜については既に報告がなされている。アルキルチオール誘導体の単分子膜の例としては、例えば、下記一般式(II)で表されるものを構成成分とするものが J. Am. Chem. Soc., 111巻, 321～335頁(1989)に報告されている。

【0003】

【化2】

..... [II]

(式中、rは8, 10, 11, 15, 17又は21を示し、Mは $-CH_3$, $-CH=CH_2$, $-COOH$, ハロゲン原子, $-CO_2CH_3$ 又は $-CN$ を示す。)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記一般式(II)で表されるアルキルチオール誘導体は、置換基Mとして、DNAセンサーや分子素子等の用途に使用し得る機能性基を有しておらず、従って、このアルキルチオール誘導体で構成される単分子膜はそれらの用途に適しているとは言い難い。

【0005】本発明は上記従来の実情に鑑みてなされたものであって、DNAセンサーや分子素子等の機能材料の用途に好適な、分子内にオリゴヌクレオチド構造を有する化合物で構成される単分子膜を提供することを目的とする。

★【0006】

【課題を解決するための手段】請求項1のオリゴヌクレオチド単分子膜は、金属基板表面に形成された単分子膜であって、分子内にオリゴヌクレオチド構造を有する化合物が、硫黄原子を介して金属基板表面に結合している構造を有することを特徴とする。

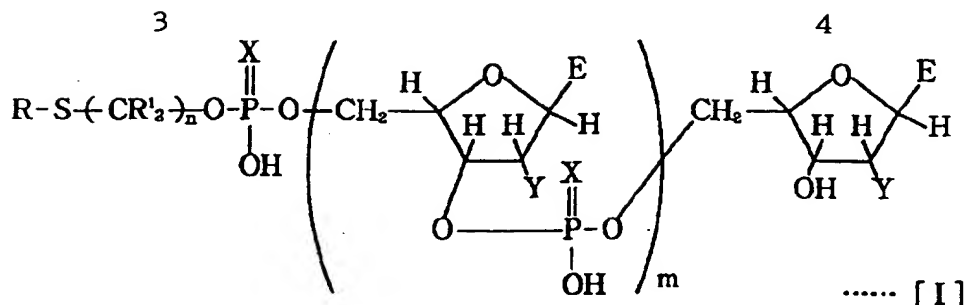
【0007】請求項2のオリゴヌクレオチド単分子膜は、請求項1の単分子膜において、下記一般式(I)で表されるオリゴヌクレオチドから誘導されることを特徴とする。

【0008】

【化3】

★

E



(式中、Rは水素又はチオールの保護基を示し、R¹は水素又は炭素数1～3のアルキル基を示し、Eは核酸塩基を示し、XはS又はOを示し、Yは水素又はOHを示し、mは1～20の整数を示し、nは8以上の整数を示す。)

【0009】即ち、本発明者は、DANセンサーや分子素子等の機能材料の用途に好適な単分子膜を提供するべく、鋭意研究を重ねた結果、構造中にオリゴヌクレオチド構造を含む単分子膜はDNAセンサーや、分子素子等に用いるのに好適であることを見出し、本発明を達成した。

【0010】以下に本発明を詳細に説明する。

【0011】前記一般式(I)において、Eの核酸塩基としては、アデニン、グアニン、チミン及びシトシン等よりなる群から適宜選択される核酸塩基が挙げられる。

【0012】Rのチオールの保護基としては、アセチル*

*基、2-テトラヒドロピラニル基、又は、アルコキシ基等の置換基を有していても良いトリフェニルメチル基等が挙げられる。

【0013】nは8以上の整数であるが、nが大きすぎるもの、例えば20以上のものは試薬の入手が困難である。通常は、10～18であることが好ましい。

20 【0014】本発明に係るオリゴヌクレオチドのうち、Rが保護基であるものは、例えば次のプロセスに従って製造することができる。

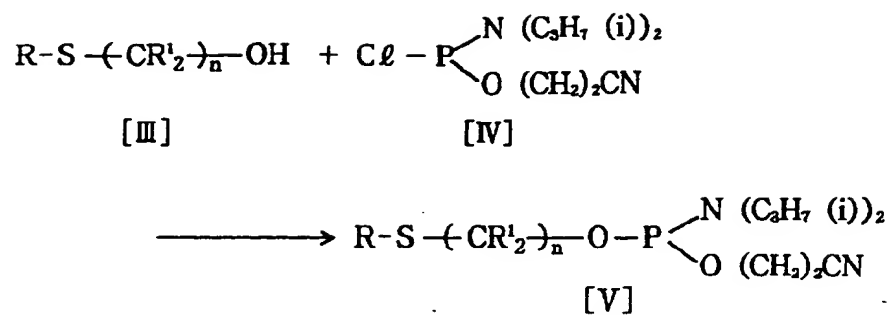
【0015】

【化4】

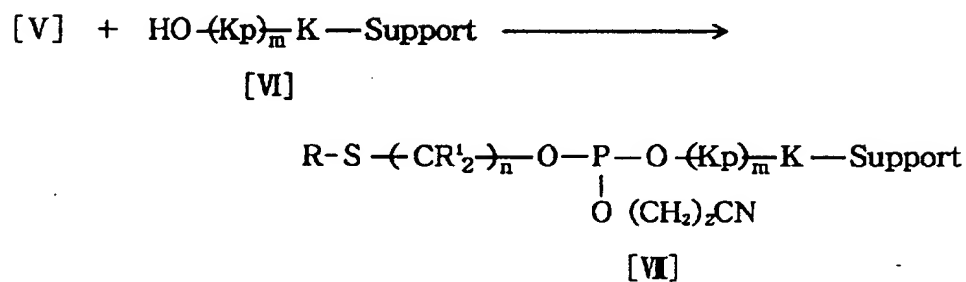
E

5
ステップA:

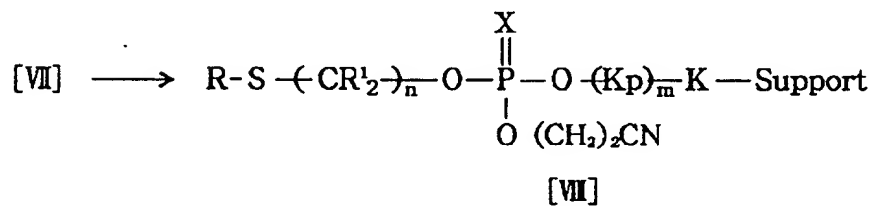
6



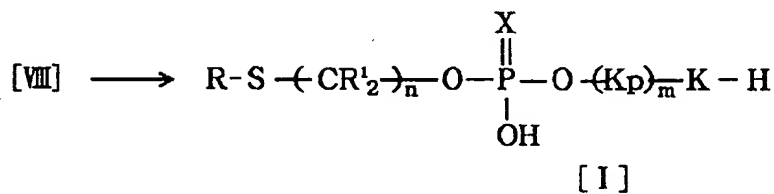
ステップB:



ステップC:



ステップD:



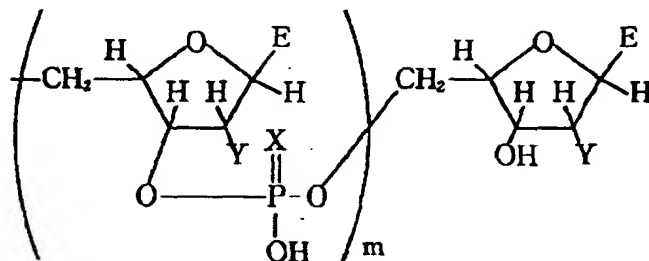
【0016】

40【化5】

E

7
(A~Dの各ステップにおいて、R, R', X, n及びmは前記一般式 [I]
におけると同様である。

-(Kp)_m-K- は一般式 [I] における



を表し、また、-SupportはDNA自動合成装置における、オルゴヌクレ
オチドの支持体を表す。）

【0017】上記の各ステップのうち、Aのステップ
は、例えば、塩化メチレン等の溶媒中、ジイソプロピル
アミン等の存在下に20~25℃の温度で行なわれる。
また、B, C, Dの各ステップは、通常はDNA自動合
成装置中で行なわれる。Bのステップは、例えば、アセ
トニトリル中に行なわれる。Cのステップは、XがSの
場合は試薬としてテトラエチルチウラムジスルフィドを
用いて行なわれ、XがOの場合は試薬としてヨウ素を用
いて行なわれる。Dのステップはアンモニア等の塩基を
用いて行なわれる。

【0018】また、前記一般式(I) において、Rが水素
であるオリゴヌクレオチドは、上記で得られたオリゴヌ
クレオチドから常法により保護基を脱離させることによ
り得られる。

【0019】このようなオリゴヌクレオチドで構成され
る本発明の単分子膜は、前記一般式(I) において、Rが
Hの場合は、前述のJ. Am. Chem. Soc., 1
11巻, 321~335頁(1989) 記載の方法に準
じた方法で製造することができる。また、前記一般式
(I) においてRがチオール保護基の場合には、次のよ
うにして単分子膜を作成することができる。



*

(式中、tは8~18の整数、Zはアルキル基、ハロゲン原子、水素、
シアノ基等を示す。)

【0023】

【作用】オリゴヌクレオチド構造を有する化合物よりなる
単分子膜であれば、DNAセンサー、分子素子用材料
として有用な単分子膜が提供される。

【0024】

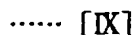
【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に
説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の
実施例により限定されるものではない。

*【0020】即ち、本発明に係る一般式(I) で表される
オリゴヌクレオチドをエタノール、エタノール/水(バ
ッファー)、アセトニトリル/水(バッファー)等の溶
媒に溶解し、この溶媒中にジクロロ酢酸、メタンスルホ
ン酸、p-トルエンスルホン酸ピリジン塩等の酸類を加
え、溶液中でチオールの保護基を外し、チオールを取り
出すか、或いは取り出して精製すること無く、その溶液
中に清浄なAu, Ag又はCu等の重金属表面を有する
基板を浸漬し、1時間~3日程度、10~50℃で放置
した後、当該基板を引き上げるにより、該基板上に
本発明の単分子膜を形成することができる。なお、この
場合、フェノール、クレゾール等のフェノール類を保護
基のアクセプターとして使用することができる。

30 【0021】また、本発明の単分子膜は、オリゴヌクレ
オチドと共に他のアルキルチオール誘導体を含む混合単
分子膜として形成することもできる。ここで使用される
アルキルチオール誘導体としては、例えば、下記一般式
(IX)で表されるアルキルチオール誘導体が挙げられる。

【0022】

【化6】



※【0025】実施例1

前記一般式(I) において、R=H, R'=H, E=アデ
ニン, X=S, Y=H, m=4, n=11であるオリゴ
ヌクレオチド[la]の合成

A: 前記一般式(III) において、R=アセチル基, R'
=H, n=11の化合物[IIla] 246mg、前記構造式
(IV)の化合物355mg、及び、ジイソプロピルアミン
386mgを塩化メチレン8mlに溶解し、20~25

※50

℃で1時間反応させた。

【0026】反応液を酢酸エチルで抽出し、抽出液をシリカゲルを担体とし、*n*-ヘキサノ-クロロホルム-トリエチルアミン(4.5:4.5:1 容量比)を展開液とするカラムクロマトグラフィーにかけ、前記一般式(V)において、R=アセチル基、 $R^1 = H$ 、 $n=11$ の化合物(Va)397mgを得た。このものの分析結果は次の通りである。

【0027】 1H NMR (CDCl₃)、TMS標準、300MHz

1.18 (m, 12H), 1.27 (m, 14H), 1.58 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.64 (t of d, 2H), 2.86 (t, 2H), 3.60 (m, 4H), 3.80 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl₃)、75Hz

20.34, 24.58, 25.91, 28.78, 29.00, 29.12, 29.28, 29.42, 29.48, 29.52, 30.62, 31.19, 42.95, 58.29, 63.71, 117.66, 196.00

^{31}P NMR (60% H₃ PO₄, 外部) 109.25 Hz

-147.7

B~D: DNA合成装置中で反応を行なった。

【0028】DNA合成装置中で、前記一般式(VI)においてEがアデニンであり、YがHであり、mが4である化合物(VIa)に、上記化合物(Va)をアセトニトリル中で反応させて、前記一般式(VII)において、R=アセチル基、 $R^1 = H$ 、 $n=11$ 、 $m=4$ 、Y=H、E=アデニンの化合物(VIIa)を得た。この化合物(VIIa)にテトラエチルチウラムジスルフィドを反応させて、前記一般式(VIII)において、R=アセチル基、 $R^1 = H$ 、 $n=11$ 、 $m=4$ 、X=S、Y=H、E=アデニンの化合物(VIIIa)を合成した。この化合物(VIIIa)をアンモニア水で処理したところ、保護基のアセチル基がはずれ、目的とするオリゴヌクレオチド(Ia)を得た。

【0029】なお、これら一連の反応はApplied Biosystems User Bulletin 58-2 (1991)に記載の方法に準じて行なった。

【0030】得られたオリゴヌクレオチド(Ia)の高速液体クロマトグラフィーによる分析結果は次の通りである。

【0031】カラム C-18 逆相カラム
グラジエント(直線)

A液: 0.05M酢酸アンモニウム

10 B液: アセトニトリル

グラジエントプログラム

スタート: A95%+B5%

30分後: A40%+B60%

37.66分後: A0%+B100%

検出波長 260nm

温度 25℃

上記の条件におけるリテンションタイムは20分であった。

【0032】単分子膜の製造

20 エタノールに上記で合成したオリゴヌクレオチド(Ia)

0.05mM及びドデカンチオール0.5μMを溶解

し、この混合溶液中に1.2cm×1.2cmのAu表面を有する基板(1.2cm×1.2cmのシリコンウェハー上にCrを膜厚250Å、更にその上にAuを膜厚15000Åの厚さに蒸着したもの)を25℃で24時間浸漬した。その後、基板を引き上げ、エタノールで洗浄し、本発明の単分子膜を得た。

【0033】得られた単分子膜の分析値は以下の通りである。

30 膜厚(エアソメトリーにて測定): 19Å

接触角(水): 6°

【0034】

【発明の効果】以上詳述した通り、本発明のオリゴヌクレオチド単分子膜によれば、DNAセンサー、分子素子用等の機能材料としての用途に工業的に極めて有用な単分子膜が提供される。

E